

Lactococcus lactis ssp. *lactis* ML₈의 Nisin 생산 및 저항 특성

김등양 · 이형주*
서울대학교 농과대학 식품공학과

Charaterization of Nisin Production and Resistance of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ML₈

Kim, Deung-Yang and Hyong-Joo Lee*

Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

Abstract — To investigate nisin production and resistance of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ML₈ (*L. lactis* ML₈), effects of medium, pH of culture broth, and cell growth on the nisin activity, and effect of nisin with or without Ca²⁺ ion on the growth of *L. lactis* were analyzed. In the bio-assay of nisin by the agar diffusion method, inhibition-zone diameter of *Micrococcus flavus* was propotional to the logarithm of nisin concentration ranged 0.5~20 unit/ml (12.5~500 ng/ml). Nisin activity of the pasteurized culture filtrates of *L. lactis* ML₈ was high at pH 2~3 but was inactivated completely at pH over 6.0. Nisin production of the *L. lactis* ML₈ cultured on LTB broth increased at late logarithmic phase and reached 10.5 unit/ml after 16 hr. The cell growth of *L. lactis* LM 0230, a plasmid free and nisin sensitive strain, was inhibited on agar medium containing 7 unit/ml of nisin, while *L. lactis* ML₈ showed high survival ability at 20 unit/ml of nisin. When 40 mM Ca²⁺ ion was added to Elliker broth with 8 unit/ml of nisin, the growth pattern of *L. lactis* ML₈ was similiar to that on control medium which did not contain nisin and Ca²⁺ ion, and this suggested that Ca²⁺ increased the nisin resistance of the *L. lactis*.

유산균은 유제품에서 유당과 단백질 대사 등에 관여하는 이외에 배양 중 펩타이드상의 항생물질을 생산하는데 *Lactococcus lactis*(*L. lactis*)는 nisin과 diplococcin을, *Lactobacillus acidophilus*는 lactocidin과 acidophilin 등을 분비하는 것으로 알려져 있다(1).

일반적으로 nisin의 항생효과는 Gram양성균에 대하여 매우 커서 Clostridia와 같은 식중독균 또는 부패균의 영양세포나 그 포자에 대해서는 생육억제 및 항생효과가 크지만, Gram음성균이나 곰팡이, 효모에는 항균효과가 없는 것으로 알려졌다(2,3).

Nisin은 인체내에서 단백분해효소에 의해 분해되기 때문에 사람에게 무해한 식품보존제로 사용될 수 있는

펩타이드 항생물질로서, 영국, 미국, 프랑스, 이탈리아 등 여러나라에서는 식품에 10 ppm 농도로 첨가를 허용하고 있고(2) 유제품, 과채류(2,4), 육제품(5-7) 등의 식품에 매우 효과적으로 적용될 수 있음이 보고되었다.

Nisin은 일종의 양이온 계면활성제로 작용하며 dehydroalanine과 같은 불포화 아미노산이 존재하여 미생물 세포막 효소의 sulfhydryl기에 대한 acceptor로 작용하기 때문에 세균의 세포막 반응에 의한 능동수송과 산화반응을 저해하게 되어 세포를 용해시키는 것으로 알려졌다(2,8,9). 유산균의 nisin 생성 및 저항성에 관련된 특성은 plasmid와 관련된 것으로 알려졌는데 균주간에 이 유전자가 전달될 수 있는 것으로 보고되었다(10,11). 예를들어 *L. lactis* ATCC 7962에서 *Leuconostoc* sp.로 전달된 nisin plasmid는 17.5 Mdal인 것으로 알려졌다(12). 2종 이상의 균주를

Key words: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, nisin production, nisin resistance, Ca²⁺ ion effect on the nisin resistance

*Corresponding author

사용하여 starter로 사용할 경우, 한 균주가 nisin을 생산하는 균주이면 다른 균주는 nisin 저항성 균주가 요구되는데, 치즈를 숙성할 때 저항성 균주를 선발하여 조직을 개선시킨 예도 있다(4).

이와 같이 nisin 생성과 저항성 특성을 규명하면, 유산균의 종균 개발 및 발효대사에 유용하게 응용될 수 있을 것으로 예상된다. 그러나 같은 유산균이라도 그 strain에 따라 관련되는 plasmid, 그리고 각 plasmid에 관련된 특성이 다른 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 *Lactococcus lactis*의 nisin 생성 및 저항성을 규명하기 위해 배지조성이 nisin의 역가에 미치는 영향, 생육에 따른 역가변화, 그리고 저항성에 미치는 영향을 조사하였으므로 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

Nisin 생산균주로는 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ML₈(*L. lactis* ML₈) ATCC 7962를, nisin에 대한 감수성 균주로서는 *Micrococcus flavus*(*M. flavus*) NCIB 8166을, 또한 *L. lactis*의 plasmid free strain으로 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* LM 0230(*L. lactis* LM 0230)을 사용하였다. 계대배양에는 MRS 배지를 사용하였고, *M. Flavus*는 nutrient broth로 35°C에서 배양하며 사용하였다(13).

Nisin의 항생역가 측정

고체배지 확산법으로 nisin의 역가를 측정하였다. 즉, 1%의 Tween 20과 *M. flavus*의 배양 현탁액을 일정량 첨가한 nutrient agar plate상에 직경 7 mm의 구멍을 뚫고 여기에 90 μl의 nisin 용액을 첨가하여 30°C에서 24시간 배양한 후 감수성 균주의 생육저해 직경을 측정하여 항생역가의 지표로 삼았다. 표준 nisin 25 ng에 해당하는 역가를 1 unit 역가로 환산하였다(14).

Nisin의 항생역가에 미치는 배지 및 pH의 영향

Nisin의 항생역가 측정시 배지 희석액의 영향을 조사하기 위해 MRS, LTB, Elliker 배지를 pH 11로 조정하고 다음 63°C에서 30분간 열처리하여 산에 안정한 영향물질을 불활성화시키고 상온으로 냉각한 다음

pH 2.0으로 조정하였다. 처리된 배지를 0.02 N-HCl로서 4배 희석시킨 용액을 nisin 역가측정의 희석액을 사용하면서 0.5~20 unit/ml 농도의 unisin 용액역가를 고체배지 확산법으로 측정하였다. *L. lactis* 배양액의 항생역가에 대한 pH의 영향을 조사하기 위해 *L. lactis* ML₈을 LTB 배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 24 hr 배양한 다음 상정액을 여과하여(0.45 μm) pH를 조절하고 63°C에서 30분간 가열하여 살균한 다음, 위와 같은 방법으로 역가를 분석하였다.

L. lactis ML₈의 생육에 따른 항생역가의 측정

LTB 배지에 활성화된 *L. lactis* ML₈을 30°C에서 배양하면서 2시간마다 pH와 항생역가를 측정하였다. 배양여액을 pH 2로 조정하고 열처리한 다음 고체배지 확산법으로 역가를 측정하였으며 생육도는 증류수로 10배 희석하여 600 nm에서 측정한 흡광도(A₆₀₀)로 나타내었다.

L. lactis ML₈의 nisin 저항성 측정

Elliker 배지(pH 6.5, 10 ml)에 nisin 8 unit/ml과 CaCl₂ 용액(0~40 mM)을 첨가한 후 *L. lactis*의 배양액을 2%(v/v) 접종하였다. 이것을 30°C에서 16시간 배양하면서 2시간마다 1 ml씩 취하고 증류수로 5배 희석하여 흡광도(A₆₀₀)를 측정하였다.

결과 및 고찰

배지 및 pH가 nisin의 항생역가에 미치는 영향

Nisin의 역가를 측정할 때 희석액의 영향을 조사하기 위하여 여러 농도의 nisin 용액을 MRS, Elliker, LTB 배지로 희석하고 역가를 측정하였을 때 MRS 배지하에서 그 역가가 가장 높게 나타났고 LTB 배지하에서 가장 낮게 나타났다(Fig. 1). 그러나 0.02 N-HCl 용액만으로 희석했을 때는 생육저해효과가 훨씬 낮았다. 배지를 사용한 각 희석액하에서 nisin의 역가는 농도(0.5~20 unit/ml)의 log치에 비례하여 직선적인 증가를 나타내었다. 따라서 nisin의 역가를 측정할 때 희석액의 영향을 고려해야 함을 보여준다. 배지 중의 성분이 역가측정에 미치는 예로서는 polyphosphate가 알려져 있는데 이것이 배지에 존재할 경우 생육저해 직경은 작게 나타나지만 nisin의 농도변화에 따른 생육저해의 정도는 희석액이 바뀌어도

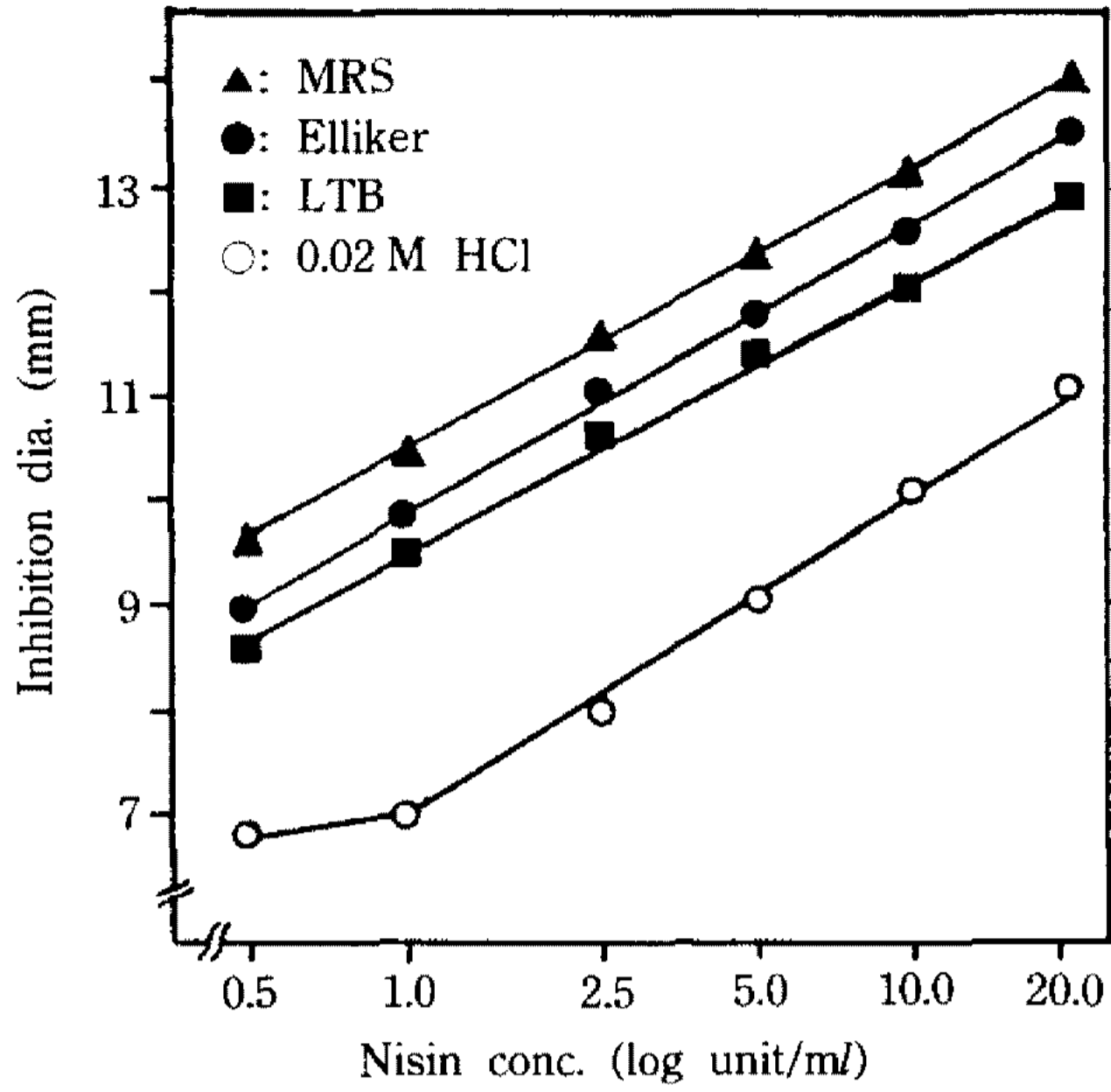


Fig. 1. Effect of medium diluent on the nisin activity. Standard nisin was diluted in each medium and the antibiotic activity was bio-assayed on a nutrient agar containing *M. flavus*. The diameter of inhibition-zone were determined after 24 hr culture.

그 차이가 별로 없는 것으로 보고되었다(15).

다음으로 pH가 항생역가에 미치는 영향을 조사하기 위하여 nisin 함유용액의 pH를 조정한 후 열처리하였을 때 표준 nisin 용액(40 unit/ml)은 pH 5.0 이하, *L. lactis* ML₈의 배양여액은 pH 4.0 이하에서 안정한 역가를 보였고 알칼리에서는 두 경우 모두 열에 의해 쉽게 역가가 상실됨을 보였다(Fig. 2). 이 사실은 nisin이 산성에서 매우 안정하다는 보고와 일치한다(2, 4). 한편, 유산균이 생성하는 nisin이 알칼리에서 불안정한 이유는 정확히 밝혀지지 않았으나 dehydroalanine같은 불포화 아미노산의 안정성과 관계있는 것으로 보고되었다(16).

***L. lactis* ML₈의 생육에 따른 nisin의 생산특성**

LTB 배지에서 *L. lactis* ML₈의 배양시 시간의 변화에 따른 항생역가의 변화는 Fig. 3과 같다. 대수기에서 역가가 증가하기 시작하면서 8시간 후에 급격히 증가하여 16시간 뒤에는 그 역가가 10.5 unit/ml에 이르렀다. 이때 pH는 초기 6.8에서 4.6으로 변하였다. 항생역가가 대수기 후반에 증가하는 것은 이 시기에 세포막에 위치하는 효소에 의해 전구체가 nisin으로 바뀌기 때문인 것으로 알려졌다(17). 이 과정 중에 pronisin의 57개 아미노산 중 23개가 떨어져 나가고

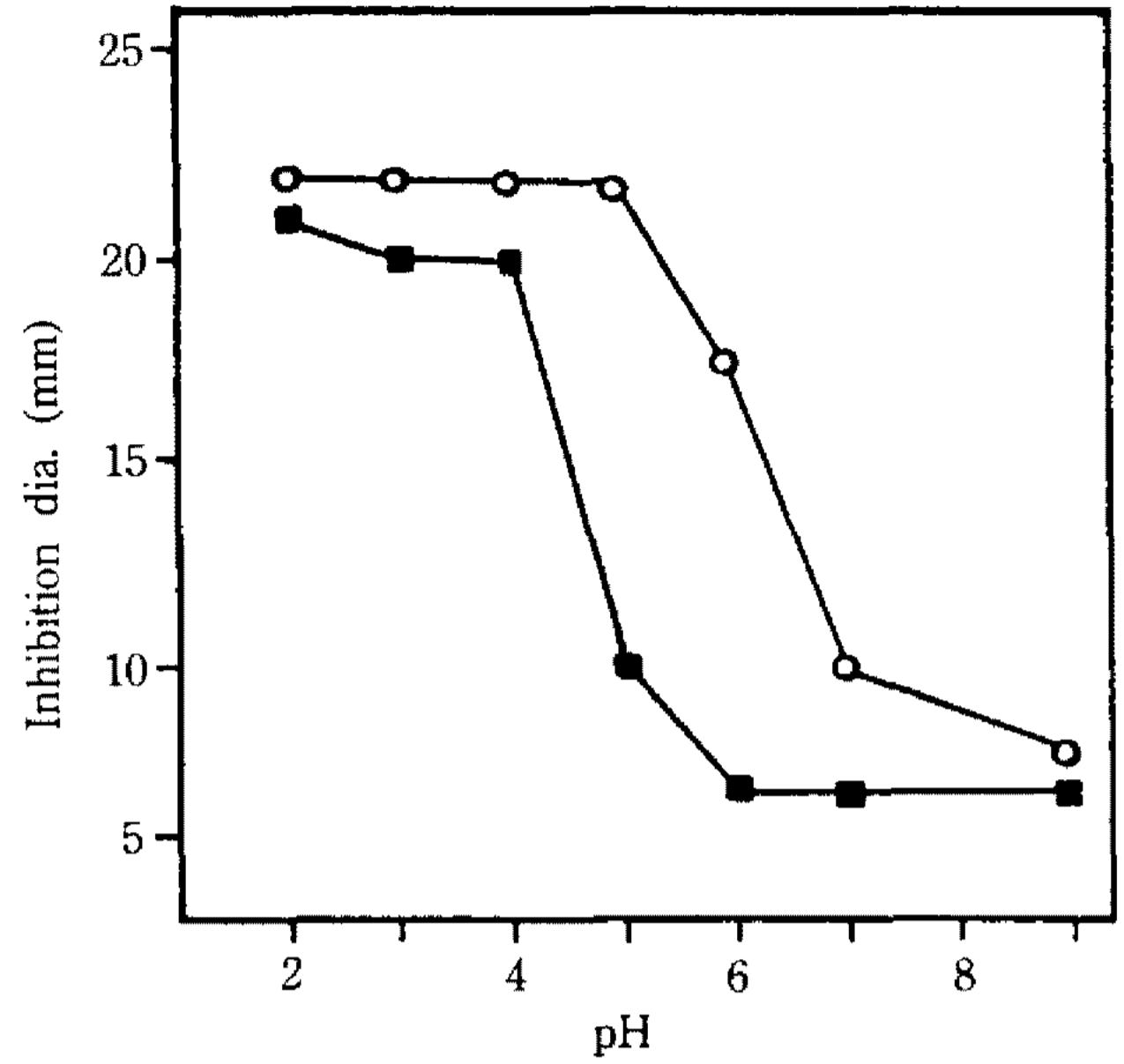


Fig. 2. Effect of pH on the nisin activity. The activity of standard nisin (40 unit/ml) in HCl solution (○) and culture filtrate (●) adjusted to different pH's were bio-assayed.

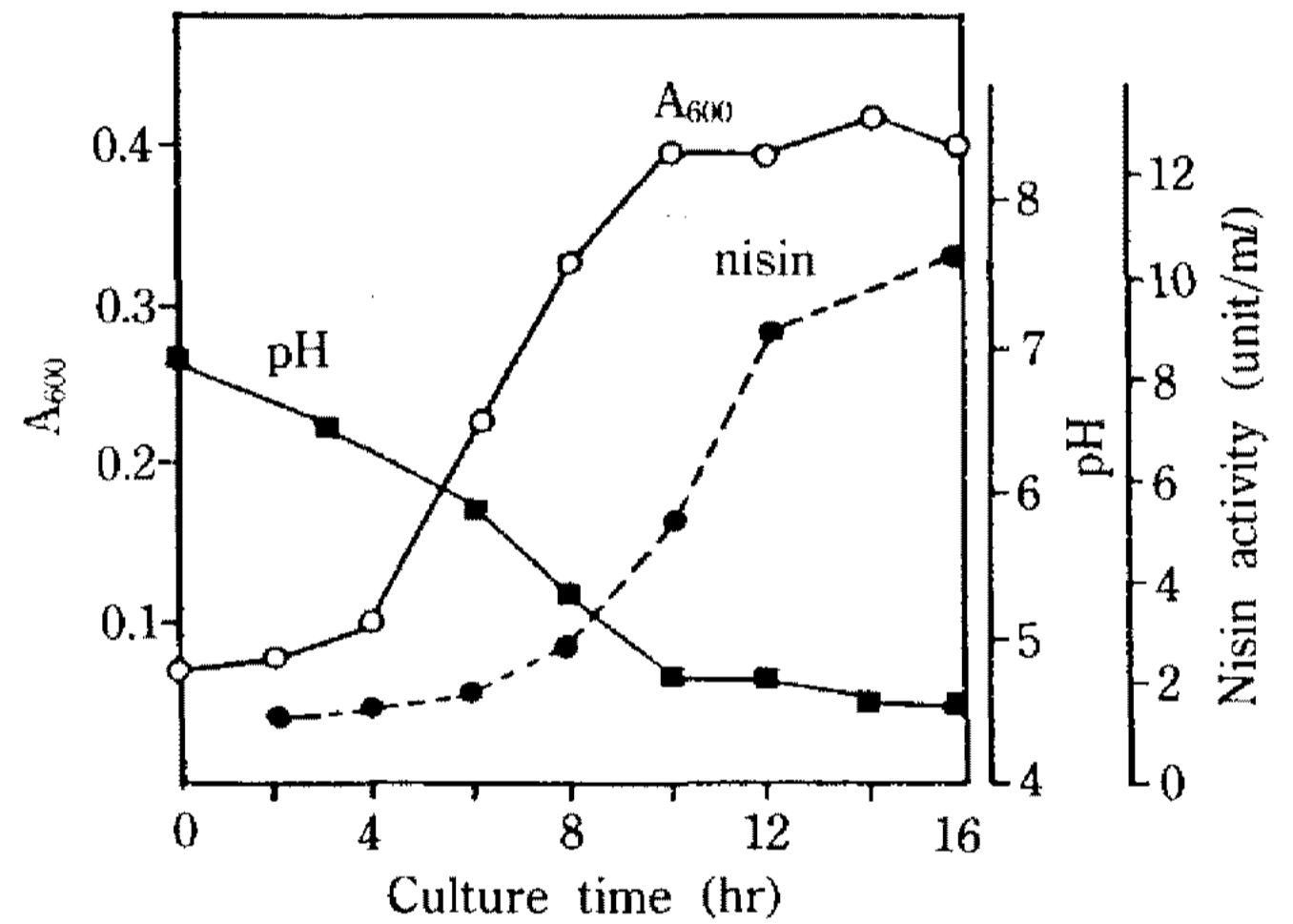


Fig. 3. Nisin production and growth of *L. lactis* ML₈ cultivated on the LTB broth at 30°C.

34개 아미노산으로 재구성 되면서 S-S 결합에 의해 고리구조를 형성함이 보고되었다(9). 따라서 pH를 조절하면서 연속배양하면 배양액 및 균체에 존재하는 nisin의 전체 역가는 훨씬 높아질 것으로 생각된다(18).

***L. lactis* ML₈의 nisin 저항성**

여러 농도의 nisin을 함유한 Elliker agar 배지에 *L. lactis* ML₈을 배양할 때의 생균수의 변화는 Fig. 4와 같다. Nisin을 생산하는 동시에 nisin에 저항성을 갖는 것으로 알려진 이 균주는 농도 8 unit/ml에서 10⁷ co-

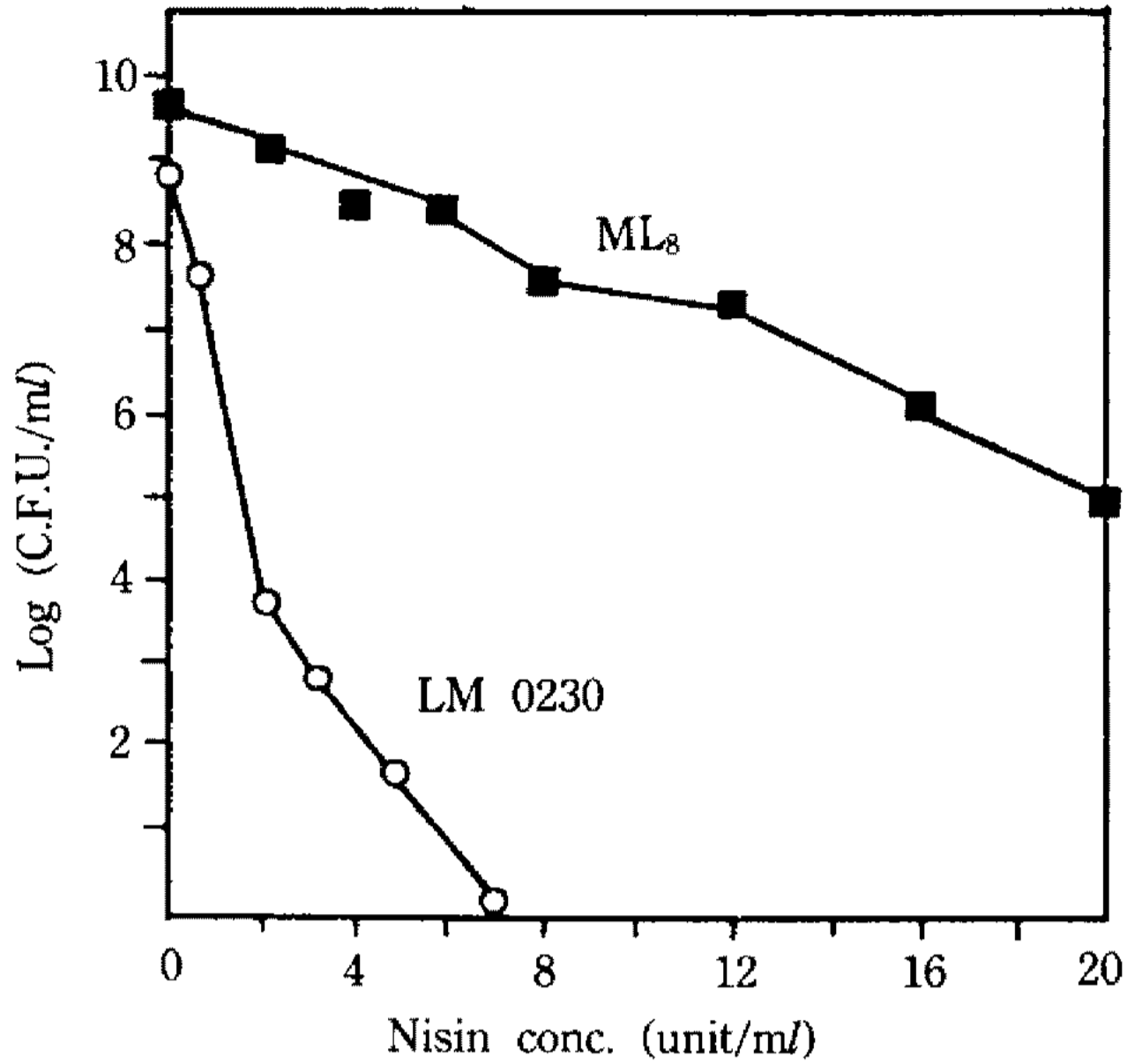


Fig. 4. Survival of *L. lactis* ML₈ and LM 0230 on Elliker agars containing nisin.

lony forming unit(CFU)를 나타내었고 20 unit/ml에서는 10⁵ CFU로 감소되었다. 이에 반해 plasmid free strain인 *L. lactis* LM 0230은 2 unit/ml에서 10⁴ CFU를 나타내었고, 7 unit/ml에서는 생육이 완전히 억제되어 nisin에 대한 내성이 매우 약한 것으로 나타났다는데 저항성이 plasmid에 기인한다는 보고와 일치한다(13, 19). 유산균이 nisin에 대하여 내성을 나타내는 이유는 nisin을 분해하는 효소를 분비하거나 (2), 균주 자체의 세포구조 변화로 인한 세포에 대한 nisin의 결합력이 저해되기 때문으로 보고된 바 있다 (20). Nisin이 0~8 unit/ml 농도로 함유된 Elliker broth에서 *L. lactis* ML₈을 배양할 때의 생육곡선은 Fig. 5와 같다. Nisin을 각 4, 8 unit/ml로 조정할 때 정체가 대조구(2시간)에 비해 각각 10, 12시간으로 연장되었음을 알 수 있다. 배양과정 중에 Nisin 첨가농도에 따라 나타나는 균주생육의 차이는 배양 24 시간 후에는 사라지는 것으로 나타났다.

Ca²⁺이온이 *L. lactis* ML₈의 nisin 저항성에 미치는 영향

L. lactis ML₈의 배양시 nisin이 첨가된 배지에서는 정체가 길어지므로 이 균주의 효율적인 배양에 문제가 된다. 한편, 우유배지나 합성배지에 Ca²⁺, Mg²⁺ 같은 2가 알칼리 금속이 있을 때 nisin에 대한 저항성에 영향을 미치는 것으로 알려졌다(20). 따라서 Ca²⁺

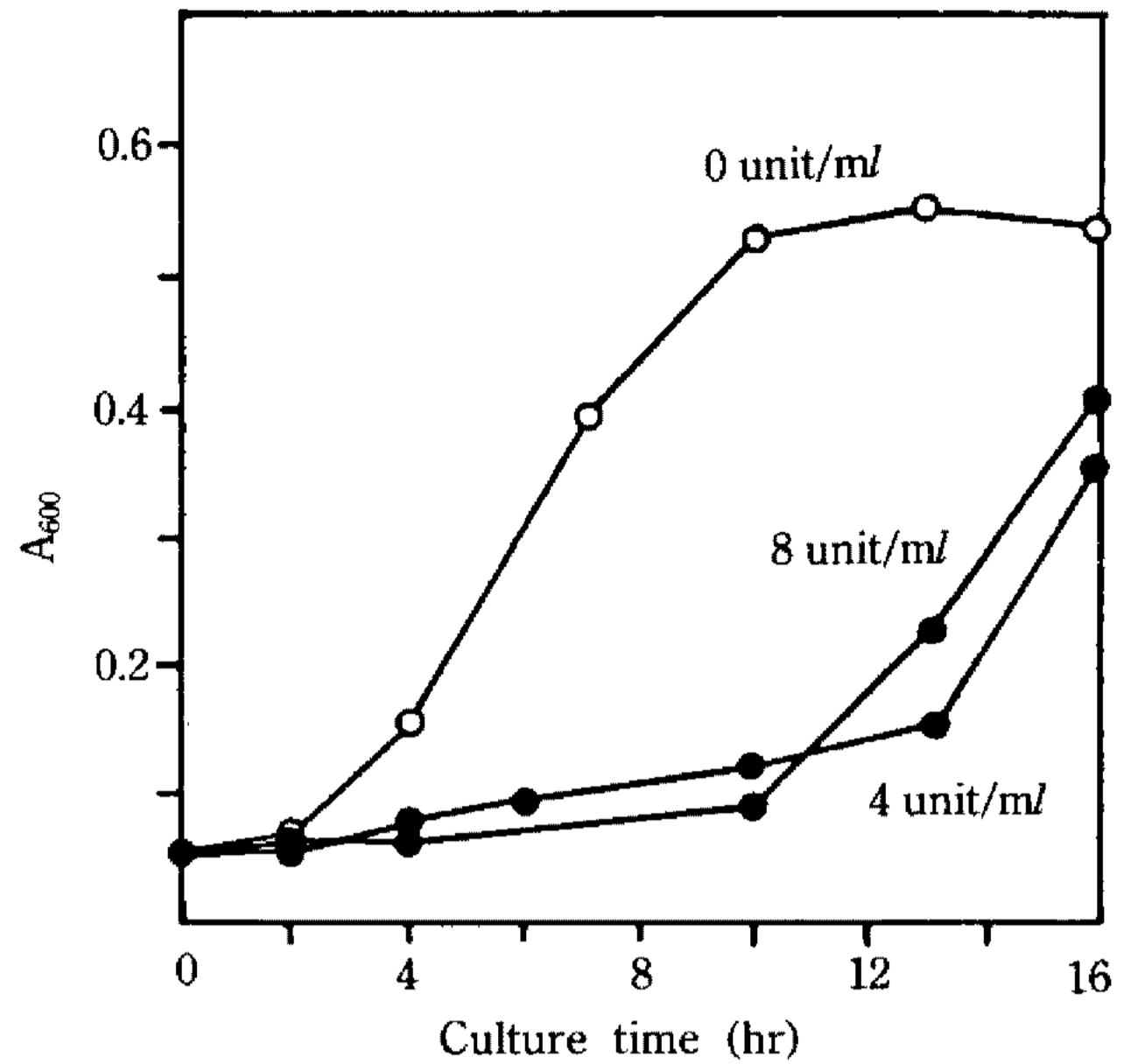


Fig. 5. Growth curves of *L. lactis* ML₈ cultivated on Elliker broth containing different concentrations of nisin.

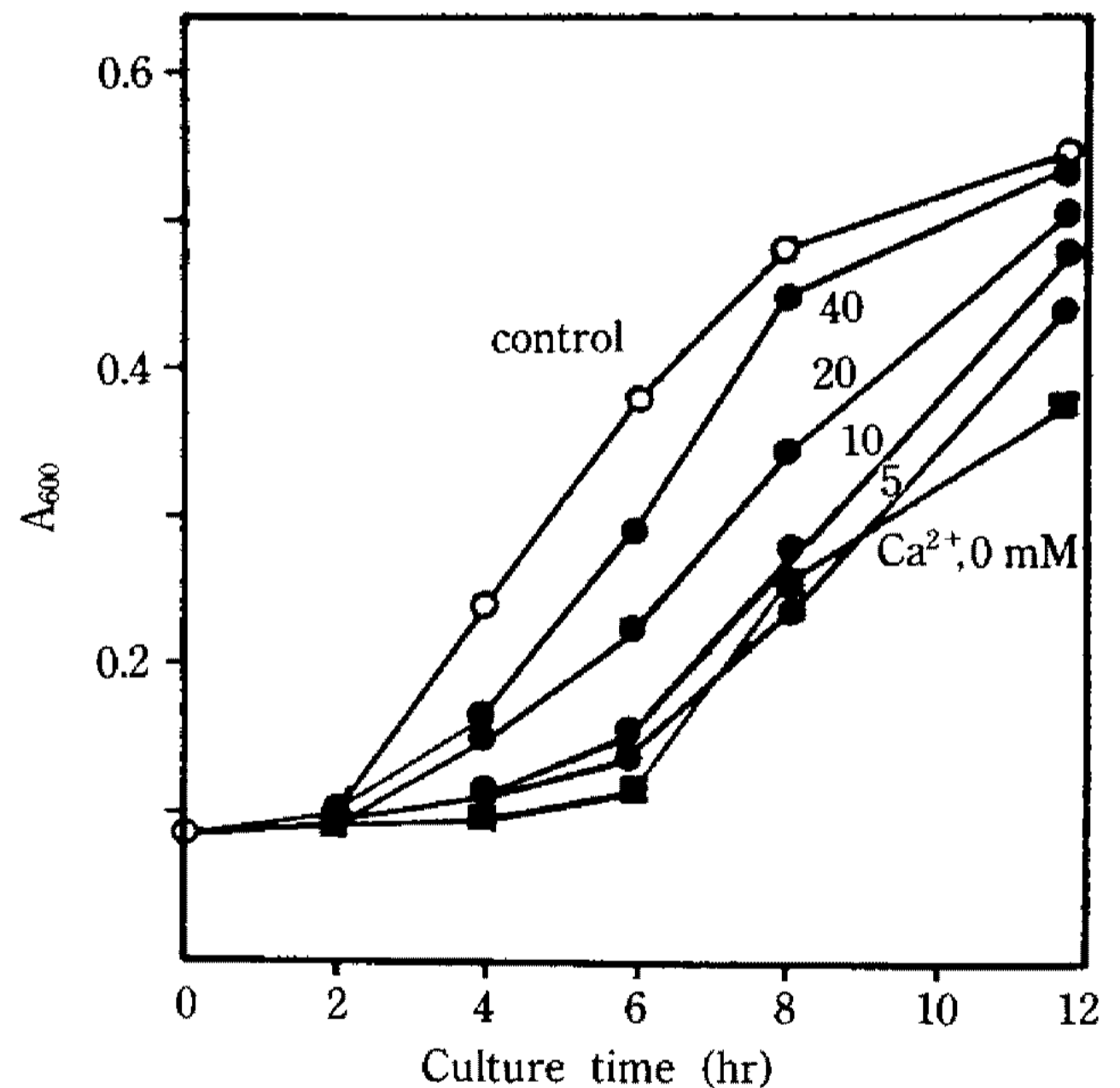


Fig. 6. Effect of Ca²⁺ ion on the growth of *L. lactis* ML₈ in the presence of nisin. The strains were cultivated on the Elliker broth containing 8 unit/ml of nisin (●, ■). Control medium did not contain either nisin or Ca²⁺ ion (○).

이온의 존재하에서 *L. lactis* ML₈의 배양시 그 생육곡선의 변화를 살펴보았는데 8 unit/ml의 nisin이 함유된 Elliker broth에 Ca²⁺이온 농도를 달리하여 첨가할 때의 생육곡선은 Fig. 6과 같다. 정체기에서는 흡광도에서 처리구간별 차이가 없으나 배양 2시간 이후의 대수기에서는 Ca²⁺이온 농도에 따라 현저한

차이를 보여주고 있다. 즉 Ca^{2+} 이온의 농도가 5 mM에서 40 mM로 증가함에 비례하여 흡광도가 증가함을 나타내었다. 또한 Ca^{2+} 이온의 농도가 40 mM일 때의 생육곡선은 nisin 및 Ca^{2+} 이온이 첨가되지 않은 배지에서의 생육곡선과 큰 차이가 없었다. 따라서, Ca^{2+} 이온의 존재하에서는 *L. lactis* ML₈의 nisin에 대한 저항성이 높아져 생육속도가 커지게 됨을 알 수 있었다.

요 약

Lactococcus lactis ssp. *lactis* ML₈(*L. lactis* ML₈)의 nisin 생산과 저항 특성을 구명하기 위하여 배지의 종류 및 pH가 nisin의 역가에 미치는 영향, 균체의 생육에 따른 nisin의 생산특성, nisin이 균체생육에 미치는 영향 및 Ca^{2+} 이온의 존재가 균주의 nisin 저항성에 미치는 영향을 조사하였다. Nisin의 역가를 *Micrococcus flavus*에 대하여 항생효과를 나타내는 성질을 이용하여 agar diffusion법으로 측정하였을 때, *M. flavus* 생육에 대한 저해직경은 nisin 농도(0.5~20 unit/ml)의 log치에 비례하였다. *L. lactis* ML₈을 배양하고 그 상침액의 nisin 역가를 측정하였을 때 pH 2~3에서 가장 높았으나 알칼리 조건에서는 거의 상실되었다. LTB 배지에서 *L. lactis* ML₈을 배양시 nisin의 역가는 균체의 생육이 대수기에 도달할 때 급격히 증가하여 16시간 후에는 10.5 unit/ml에 달하였다. Nisin 내성이 없는 plasmid free strain인 *L. lactis* LM 0230은 nisin이 7 unit/ml 함유된 Elliker agar 배지에서 생육이 억제되었으나 *L. lactis* ML₈은 20 unit/ml의 농도하에서도 상당히 높은 생육을 보였다. Nisin이 8 unit/ml 함유된 Elliker 배지에 Ca^{2+} 이온을 40 mM 첨가했을 때 *L. lactis* ML₈의 생육곡선은 nisin 및 Ca^{2+} 이 첨가되지 않은 대조구와 비슷하게 나타나 Ca^{2+} 이온이 Nisin 저항성을 상당히 높여주는 것을 보여주었다.

참고문헌

1. Marshal, V.M.: *J. Dairy Sci.*, **54**, 559 (1987)
2. Hurst, A.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **27**, 85 (1981)
3. Stumbo, C.R. and R.T. O'Brien: *Food Technol.*, **10**, 352 (1956)
4. Lipinska, E.: *Nisin and its application in Antibiotics and anti-biotics in agriculture with special reference to synergism* (M. woodvine ed.), Butterworths, Boston, 103 (1977)
5. Scott, V.N. and S.L. Taylor: *J. Food Sci.*, **46**, 117 (1981)
6. Rayman, M.K. and B. Aris: *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 375 (1984)
7. Scott, V.N. and S.L. Taylor: *J. Food Sci.*, **46**, 121 (1981)
8. Chopin, A.: *Plasmid*, **11**, 260 (1984)
9. Kaletta, C. and K.D. Entian: *J. Bacteriol.*, **173**, 1597 (1989)
10. Kozak, W.: *J. Gen. Microbiol.*, **83**, 295 (1974)
11. Fuch, P.G.: *J. Gen. Microbiol.*, **88**, 189 (1975)
12. McKay, L.L. and K.A. Baldwin: *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 68 (1984)
13. Tramer, J. and G.G. Fowler: *J. Sci. Food Agric.*, **15**, 522 (1964)
14. Stumbo, C.R. and Voris, L.: *J. Food Technol.*, **4**, 859 (1964)
15. Stumbo, C.R. and L. Voris: *J. Food Technol.*, **4**, 859 (1964)
16. Bailey, F.J. and A. Hurst: *Can. J. Microbiol.*, **17**, 61 (1971)
17. Hurst, A. and G.M. Paterson: *Can. J. Microbiol.*, **17**, 1739 (1971)
18. White, R.J. and A. Hurst: *J. Gen. Microbiol.*, **53**, 171 (1968)
19. Klaenhamer, T.R. and R.B. Sanozky: *J. Microbiol.*, **131**, 1531 (1985)
20. Hurst, A. and Kruse, H.: *J. Microbiol.*, **16**, 1205 (1970)

(Received November 8, 1991)